

Master 2 Recherche
Elaboration de la Qualité et Sécurité Alimentaire (EQSA)

INRA Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie (UR66)

**MODULATION D'EXPRESSION DES GENES DES
TRANSPORTEURS ABC PAR LES LACTONES
MACROCYCLIQUES**

Présenté par :
Alpha Amadou DIALLO

Encadrants :

Anne LESPINE

Laïla MSELLI-LAKHAL

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement Anne LESPINE et Laïla MSELLI-LAKHAL, mes responsables de stage, qui m'ont accueilli et guidé tout au long de ce travail.

Je remercie également Jacques DUPUY pour le temps qu'il m'a consacré pour ses explications et pour la confiance qu'il m'a témoigné dans ma découverte de l'expérimentation cellulaire et moléculaire.

Ma gratitude va à Michel ALVINERIE ainsi qu'à Thierry PINEAU, directeur de l'UR66, qui ont bien voulu m'accueillir dans l'unité.

Je tiens également à remercier Jean-François SUTRA, Solange KIKI, Cécile SOTTO et Christiane BORIN pour leur accueil, leur gentillesse et leur disponibilité.

Enfin merci à l'ensemble du personnel INRA de pharmacologie pour leur accueil et leur gentillesse tout au long de mon séjour.

RESUME

L'ivermectine est un dérivé semi-synthétique de la famille des lactones macrocycliques. C'est un antiparasitaire à très large spectre, efficace sur de nombreux nématodes et certains ectoparasites. Parmi les acteurs qui interviennent dans le devenir des lactones macrocycliques (LMs) dans les organismes hôte et parasite, les transporteurs ATP binding cassette multidrogue (MDR) jouent un rôle majeur et participent à l'efflux actif de ces molécules hors de l'organisme. Pour comprendre les mécanismes qui conditionnent son devenir dans l'organisme hôte et parasite, nous avons étudié la modulation de l'expression des ARNm qui codent pour des transporteurs d'efflux : *abcb1a*, *abcb1b*, *abcc1*, *abcc2*, *abcg2* et pour le cytochrome *Cyp2b10* dans la lignée JWZC19 dérivée d'hépatocytes primaires de souris immortalisés et surexprimant le récepteur nucléaire *Constitutive Androstane Receptor* (CAR). Les cellules sont cultivées pendant 48 heures avec ou sans du 1, 4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) ligand synthétique de CAR ou de l'ivermectine à doses croissantes (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M et 10 μ M). L'expression des ARNm transcrits est quantifiée par QPCR. Les résultats obtenus montrent que l'ivermectine induit de façon dose dépendante l'expression du gène *abcb1* et à 10 μ M entraîne une répression du gène *Cyp2b10*. Nos résultats obtenus dans une lignée ne surexprimant pas CAR montrent que ces modulations d'expression sont CAR dépendantes. Aucune modulation d'expression significative n'a été obtenue pour les gènes *abcb1b*, *abcc1*, *abcc2*, et *abcg2*

Mots clés : lactones macrocycliques, ivermectine, transporteurs d'efflux, récepteurs nucléaires

SUMMARY

Ivermectin is a semi-synthetic derivative belonging to the macrocyclic lactones family. This antiparasitic compound exhibits a broad spectrum of activity against many nematodes and ectoparasites. Among the factors which modulate its bioavailability in host and parasites, efflux transporters belonging to the ATP binding cassette family (ABC) play an important role in its active efflux out of the organism. In order to evaluate the mechanisms which modulate its bioavailability, we studied the modulation of the expression of different ARNm (*abcb1a*, *abcb1b*, *abcc1*, *abcc2*, *abcg2*, *cyp2b10*) coding for the P-glycoprotein (P-gp), Multidrug Related Protein (MRP) Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) and for the cytochrome P450 2b10 in mouse immortalized hepatocytes overexpressing the nuclear receptor Constitutive Androstane Receptor (CAR). The cells are cultivated for 48 hours with or without 1,4-bis [2 (3,5-dichloropyridyloxy)] benzene (TCPOBOP), a CAR synthetic ligand, or ivermectin (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M and 10 μ M). The expression of ARNm is estimated by QPCR. The results obtained show the induction of *abcb1a* gene in a dose-dependant way and repression of *cyp2b10* gene by ivermectin at the concentration of 10 μ M. Concerning the others genes studied (*abcb1b*, *abcc1*, *abcc2* and *abcg2*), no detectable effects were registered after the treatment by ivermectin..

Key words: macrocyclic lactones, ivermectin, efflux transporters, nuclear receptor

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : ATP « binding cassette »

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ANOVA : Analyse de variance

ARN: Acide Ribonucléique

BCRP: Breast Cancer Resistance Protein

CAR : *Constitutive Androstane Receptor*

Ct : Cycle seuil

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Diméthyl Sulfoxide

dNTP : DésoxyNucléotide TriPhosphate

HBSS : solution saline tamponnée de Hanks'

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

LM: Lactone Macrocyclique

MDR: Multidrug Resistance

MRP: Multidrug Related Protein

PBS : Tampon Phosphate Salin

PCR : Polymerase Chain Reaction

P-gp : P- Glycoprotéine

RT : Reverse Transcriptase

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SVF : Sérum de Veau Foetal

TBP: TATA-Box Binding Protein

TCPOBOP: 1, 4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene

SOMMAIRE

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| REMERCIEMENTS | 2 |
| RESUME | 3 |
| SUMMARY | 4 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 5 |
| INTRODUCTION | 10 |
| I. MATERIELS ET METHODES | 13 |
| 1. Les réactifs et solvants utilisés..... | 13 |
| 2. Modèle et culture cellulaire | 13 |
| 2.1. Modèle cellulaire | 13 |
| 2.2. Culture cellulaire | 13 |
| 3. Traitement des cellules | 14 |
| 4. L'extraction des ARNs..... | 14 |
| 5. Technique de mesure de l'expression des gènes | 14 |
| 5.1. La transcriptase reverse (RT) | 15 |
| 5.2. La PCR quantitative | 15 |
| 5.2.1. Principe de la PCR | 15 |
| 5.2.2. Dessin d'amorce..... | 17 |
| 5.2.3. Mise en œuvre de la QPCR | 18 |
| 5.2.4. Méthode du 2- $\Delta\Delta$ Ct | 18 |
| 6. Test de fonctionnalité des transporteurs d'efflux..... | 19 |
| 7. Suivi du transport de l'ivermectine par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) | 19 |
| 8. Tests statistiques | 21 |
| II. RESULTATS | 22 |
| 1. Caractérisation de la lignée cellulaire..... | 22 |
| 1.1. Expression des transporteurs MDR et cytochrome..... | 22 |
| 1.2. Fonctionnalité des transporteurs..... | 23 |
| 1.3. Conclusion | 24 |
| 2. Influence de l'ivermectine sur l'expression des gènes codant pour le cytochrome Cyp2b10 et les transporteurs ABC | 24 |
| 2.1. Implication de CAR dans les modulations d'expression de gènes observées | 26 |

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 3. Dosage de l'ivermectine | 27 |
| III. DISCUSSION | 28 |
| CONCLUSION | 32 |
| BIBLIOGRAPHIE | 33 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1: Etapes de la réaction de PCR | 16 |
| Figure 2: La PCR, une amplification exponentielle..... | 17 |
| Figure 3 : Expression constitutive du gène Cyp2b10 dans les lignées JWZ et JWZC19..... | 22 |
| Figure 4: Expression constitutive des transporteurs dans la lignée JWZC19..... | 23 |
| Figure 5: Analyse quantitative de l'accumulation intracellulaire de Hoechst 33342..... | 24 |
| Figure 6: Influence de l'ivermectine sur l'expression du gène Cyp2b10 sur la lignée JWZC19..... | 25 |
| Figure 7: Influence de l'ivermectine sur l'expression du gène Abcb1a sur la lignée JWZC19 | 25 |
| Figure 8: Influence de l'ivermectine sur l'expression des gènes Abcb1b, abcc1, abcc2 et abcg2 sur la lignée JWZC19 | 26 |
| Figure 9: Influence de l'ivermectine à 10µM sur l'expression des gènes Cyp2b10 et abcb1a dans les lignées JWZC19 et JWZ. | 27 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1: Préparation des réactifs pour la RT-PCR | 15 |
| Tableau 2: Les séquences d'amorces utilisées pour la RT-PCR..... | 17 |
| Tableau 3: Dosage de l'ivermectine dans les cellules JWZ et JWZC19 | 27 |

INTRODUCTION

La lutte antiparasitaire a été révolutionnée dans les années 80 par la mise sur le marché des lactones macrocycliques (LMs) ou endectocides. Depuis, ces molécules ont été largement utilisées chez les animaux d'élevage, de compagnie et chez l'homme. Elles sont actives sur de nombreuses espèces et à de nombreux stades parasitaires avec une activité antihelminthique, insecticide et acaricide d'où leur nom d'endectocides. Cependant, en raison d'un usage non adapté (utilisation de posologie ou de voies, non préconisées et / ou utilisation chez des espèces pour lesquelles il n'existe pas d'autorisation de mise sur le marché) des phénomènes de résistance parasitaire sont apparus chez de nombreuses espèces. En raison de l'absence de développement de nouvelles molécules, il est primordial d'optimiser l'utilisation des LMs en respectant leur sécurité d'usage. Une des priorités actuelles de l'équipe de Pharmacocinétique dans le laboratoire INRA de Pharmacologie- Toxicologie, est d'assurer un usage rationnel et raisonné des LMs dans le but d'en pérenniser l'efficacité.

L'activité antiparasitaire de ces composés est directement liée à la concentration de principe actif dans l'organisme animal. Ainsi, l'optimisation de leur efficacité passe par l'augmentation de la quantité de médicament chez l'animal hôte après administration, qui devait être associée à une exposition plus importante de la cible.

La pharmacocinétique des LMs est caractérisée par une large distribution dans l'organisme et un tropisme particulier pour le tissu adipeux. Ainsi, ces molécules ont une longue rémanence dans l'organisme associée à une persistance d'efficacité particulièrement intéressante dans la lutte antiparasitaire. Au niveau du foie elles sont très peu métabolisées par les enzymes de biotransformation qui jouent un rôle discret dans le devenir de ces molécules dans l'organisme. Par contre, elles sont prises en charge par les protéines d'efflux qui conditionnent leur devenir dans l'organisme.

Parmi les nombreux facteurs pouvant moduler la biodisponibilité des LMs, la P-glycoprotéine ou P-gp (produit du gène *abcb1a* et *abcb1b* chez le rongeur) est reconnue comme un des éléments majeurs aussi bien sur des cellules [9], chez l'animal entier [1] que chez les parasites [10]. En effet, ce transporteur membranaire de la famille des « ATP binding cassette transporters » ou transporteur ABC, impliqué dans les mécanismes de polychimiorésistances (résistances multidroques ou MDR), contrôle l'efflux actif de

nombreux composés dont l'ivermectine. L'ivermectine est un inhibiteur reconnu de l'activité de transport de la P-gp [17], des multidrug resistance-associated protein, MRPs (produit du gène *abcc1* et *abcc2*) [27] et Breast Cancer Resistant Protein, BCRP (produit du gène *abcg2*). De plus, les LMs ont été montrées comme agissant *in vitro* sur la réversion de la résistance multidrogue. Elles constituent de ce fait de puissants agents potentialisateurs des chimiothérapies anticancéreuses [24]. La P-gp est retrouvée dans de nombreux tissus épithéliaux, essentiellement située sur les membranes apicales des cellules polarisées [23]. Au niveau du foie on la trouve fortement exprimée sur les canalicules biliaires (figure 6) et au niveau de l'intestin elle se situe sur les villosités du petit et gros intestin [5]. Au niveau de la barrière sang/testicule elle joue aussi un rôle de protection en empêchant les xénobiotiques de pénétrer dans le testicule. Sur la barrière placentaire, elle est localisée sur la membrane apicale du syncytiotrophoblaste d'où elle expulse les xénobiotiques dans la circulation maternelle. Au niveau de la barrière hémato-méningée, elle se situe sur les cellules endothéliales côté luminal (circulation sanguine) et restreint l'entrée des médicaments hydrophobes dans le cerveau [18, 19]. Certains animaux, tels que les souris de souche CF-1 ou les chiens Colleys ou bergers australiens, peuvent présenter une mutation spontanée d'un gène MDR (*multi-drug resistance*) codant pour la P-gp, rendant cette dernière non fonctionnelle [15, 22]. Chez les animaux homozygotes de cette mutation, l'ivermectine peut passer la barrière hémato-encéphalique même quand elle est administrée à dose thérapeutique.

De plus, chez les parasites nématodes, la résistance au LMs est associée entre autre mécanisme à une surexpression d'homologues de la P-gp. Ainsi, l'induction de transporteurs MDR par les LMs pourrait être un des mécanismes de protection contre ces médicaments, d'où l'importance d'étudier les processus impliqués dans la régulation de l'expression de ces transporteurs.

C'est ainsi que, dans la famille des transporteurs ABC, nous nous sommes focalisés sur les transporteurs *abcb1a*, *abcb1b*, *abcc1*, *abcc2* et *abcg2*. Ces transporteurs ont tous été impliqués dans la polychimiorésistance et concernent plus particulièrement l'efflux des xénotoxiques et des médicaments. Sur la base des interactions fortes décrites entre LMs et transporteur MDR, il était intéressant de rechercher l'effet de l'ivermectine dans la régulation de l'expression des gènes des transporteurs sur des cellules surexprimant le

récepteur nucléaire CAR. Ainsi, nous étudierons l'implication de CAR, dans l'éventuelle modulation d'expression des gènes des transporteurs MDR par l'ivermectine.

Par ailleurs, des études récentes ont montré l'implication de différentes classes de récepteurs nucléaires dans la défense de l'organisme contre les xénobiotiques par l'activation des gènes codant pour des enzymes intervenant dans le métabolisme de ces composés chimiques étrangers. C'est le cas du récepteur « Constitutif Androstane Receptor » (CAR) qui agit comme un « xénosenseur » induisant l'expression d'enzymes du métabolisme et des transporteurs de xénobiotiques.

Notre modèle est la lignée JWZC19 dérivée par immortalisation d'hépatocytes primaires de souris. Cette lignée, obtenue dans l'équipe de Pharmacologie Moléculaire du laboratoire INRA de Pharmacologie-Toxicologie, surexprime le récepteur nucléaire CAR. Les études réalisées dans cette équipe ont montré que ce récepteur nucléaire y est localisé dans le noyau des cellules. Etant par ailleurs constitutivement actif, sa localisation nucléaire se traduit par une activation constitutive de son gène cible Cyp2b10.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé cette lignée par rapport à l'expression des ARNm des transporteurs MDR d'intérêt et du cytochrome Cyp2b10. Nous avons vérifié la fonctionnalité de ces transporteurs par une étude de leur activité d'efflux dans ce modèle cellulaire.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le pouvoir modulateur de l'ivermectine sur l'expression des transporteurs MDR et recherché l'implication du nucléaire CAR dans cette régulation.

I. MATERIELS ET METHODES

1. Les réactifs et solvants utilisés

Pour les extractions d'ARN nous avons utilisé le Trizol (ref.15596-018, Invitrogen Cergy Pontoise France), le chloroforme (ref.899255, Interchim), l'isopropanol (ref. 415154, Carlo Erba) et l'éthanol 70% (ref.414607, Carlo Erba). Pour les étapes de Rétrotranscription et de PCR quantitative nous avons utilisé le « High capacity cDNA archive Kit » (ref.4322171, Applied biosystem) et Master Mix2x (ref. 4367659, Applied biosystems). L'Ivermectine, le Probénécide, le Diméthyl Sulfoxyde (DMSO) et le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) proviennent de Sigma Chimie Saint-Quentin Fallavier, France ; le valsopodar et le KO134 nous ont été gracieusement donnés respectivement par Novartis (Basel, Suisse) et la société Solvo (Biotechnology, Hongrie).

Les solutions stocks sont préparées et conservées à -20°C. L'ivermectine (0,5 mM ; 1 mM ; 5 mM et 10 mM) et le TCPOBOP (250µM) sont dissouts dans du DMSO.

2. Modèle et culture cellulaire

2.1. Modèle cellulaire

Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour cette étude. La lignée JWZ est une lignée d'hépatocytes primaires de souris immortalisés à l'aide de l'antigène T du virus SV40. La lignée JWZC19 dérive de la lignée JWZ par surexpression du récepteur nucléaire aux androstanes (CAR).

2.2. Culture cellulaire

Les cellules en culture sont maintenues à 37°C dans une atmosphère saturée en eau et contenant 5 % de CO₂. Elles sont cultivées dans du DMEM : 4.5 g/l glucose, - L glutamine, - L pyruvate (GIBCO 11960) additionné de 10% sérum fœtal bovin (GIBCO 10270-098), 1% L- glutamine (GIBCO 25030-024), 0.01% dexaméthasone (SIGMA 4902) et d'un mélange d'antibiotiques : 10 000 Unités/ml pénicilline G sodium + 10 000 µg/ml streptomycine en sulfate 0.85% saline (GIBCOBRL 15140-122). Le milieu est renouvelé tous les 3 jours. Lorsque les cellules atteignent un état de croissance dit « subconfluent », le milieu de culture est aspiré puis les cellules sont lavées 2 fois avec 2ml du Tampon Phosphate Salin PBS (GIBCO 14200-067). Après élimination du PBS, les cellules sont détachées à l'aide de 500µl de trypsine (GIBCO 25300-054) pendant 15 minutes à 37°C et reprises dans 6 ml de

milieu. Toutes les manipulations sont réalisées stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical. La densité cellulaire est déterminée par comptage sur lame de MALASSEZ dans 25µl de milieu de culture en microscopie optique à contraste de phase.

3. Traitement des cellules

Les cellules sont réparties dans des plaques de culture à 6 puits. Chaque puits contient 1.5×10^5 cellules dans 2 ml de milieu de culture. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les cellules sont traitées par ajout de 2µl de DMSO (témoin), 2µl de TCPOBOP (250µM) et 2µl d'Ivermectine (0,5µM ; 1µM ; 5µM ou 10µM). Après 24 heures, le milieu est changé et le traitement renouvelé.

4. L'extraction des ARNs

Pour la lyse des cellules, nous avons utilisé 1ml de trizol / puits. Le trizol contient du phénol, de l'isothiocyanate de guanidine et un inhibiteur puissant des ARNases. Le lysat est récupéré dans des tubes de 1,5ml auxquels sont ajoutés 0,2 ml de chloroforme pour 1 ml de trizol. Après incubation de 2 à 3 mn à la température ambiante et centrifugation à 12000 g pendant 15 mn à 4 °C, la phase aqueuse supérieure est récupérée dans un nouveau tube.

Pour précipiter les ARN, 0,5 ml d'isopropanol sont ajoutés et après une incubation de 10 mn à température ambiante, les ARN sont culotés par centrifugation à 12000 g pendant 15 mn à 4 °C. Les ARN apparaissent sous forme de culot colloïdal au fond du tube. Le surnageant est aspiré et 1ml d'éthanol à 70°C sont ajoutés pour éliminer les sels. Après reprise dans de l'eau stérile (ARNase free) puis agitation et centrifugation (12000 g pendant 5 mn à 4 °C), les ARNs sont dosés par spectrophotométrie aux longueurs d'ondes 260 et 280 nm.

5. Technique de mesure de l'expression des gènes

Mesurer l'expression d'un gène consiste à mesurer l'abondance à un instant donné du (ou des) ARNs messagers produits à partir ce gène. La technique de PCR quantitative permet de mesurer quantitativement l'expression des gènes. Le nom le plus communément utilisé est la qPCR pour quantitative PCR. Pour appliquer la PCR à l'étude de l'expression des gènes, une étape supplémentaire, précédant l'étape d'amplification, est nécessaire : il s'agit

de convertir des ARNm en ADN complémentaires ou ADNc. Cette étape fait appel à une transcriptase inverse ou RT (Reverse Transcriptase).

5.1. La transcriptase reverse (RT)

Afin de générer des fragments d'ADN complémentaire à partir des ARN totaux, une transcription inverse est réalisée avec le kit « High capacity cDNA archive Kit ». Pour cela, 10µl d'ARN à 0,2µg/µl, 2µl de RT-Buffer (10x), 0,8µl de dNTP (25X), 2µl de Random primers (10X), 1µl d'enzyme et 4,2µl d'eau sont incubés pendant 5 minutes à 65°C (tableau 2). Le mélange est immédiatement refroidi dans la glace. Le tout est ensuite incubé dans l'appareil à PCR (Gene Amp PCR System 2400) pendant 5 mn à 25 °C, 2 heures à 37°C puis maintenu à +4°C. Le mélange d'ADNc ainsi obtenu est ensuite dilué au 1/20 dans de l'eau.

| Réactifs | 1 réaction de 20µl | 10 réactions |
|--------------------|--------------------|--------------|
| 10x RT-Buffer | 2 | 20 |
| 25x DNTP | 0,8 | 8 |
| 10x Random primers | 2 | 20 |
| Enzyme | 1 | 10 |
| Eau | 4,2 | 42 |
| ARN 0,2µg/µl | 10 | 100 |
| Volume final | 20 | 200 |

Tableau 1: Préparation des réactifs pour la RT-PCR

5.2. La PCR quantitative

5.2.1. Principe de la PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR en anglais pour Polymérase Chain Réaction), est une méthode utilisée en biologie moléculaire permettant d'amplifier considérablement le nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN. Cette technique est basée sur une répétition de plusieurs dizaines de cycles de transition de température, sous l'action d'une ADN polymérase thermostable. Chaque cycle comporte 3 étapes (Figure 1) :

Phase de dénaturation (1 sur le schéma)

Cette étape (généralement à 95°C) permet de déshybrider les ADN, et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (2 sur le schéma)

Cette étape (généralement à 50-60°C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrices grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable.

Phase d'élongation (3 sur le schéma)

Cette étape (généralement à 72°C) permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présent dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon. L'ADN polymérase allonge ensuite les amorces par l'adjonction de nouveaux nucléotides complémentaires de la matrice d'ADN. Comme les fragments d'ADN synthétisés au cours d'un cycle servent de matrice au cycle suivant, la quantité du fragment d'ADN cible s'accroît exponentiellement au cours de la PCR.

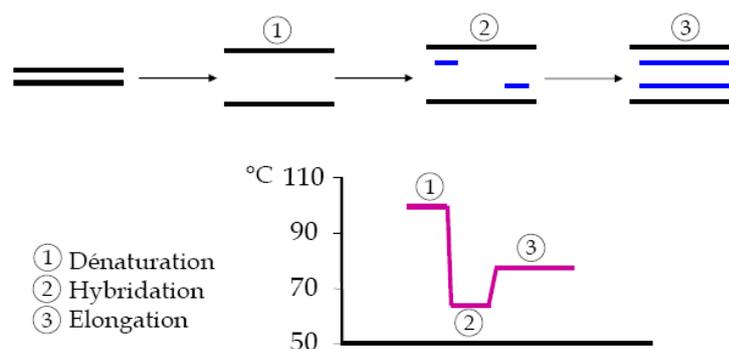


Figure 1: Etapes de la réaction de PCR

Cette réaction PCR permet à partir d'un échantillon présent en très faible quantité au départ d'amplifier de façon considérable cette région d'intérêt. Ainsi en débutant la PCR par une copie, après 40cycles, en fin de réaction 2^{40} copies de cette séquence (soit 1012 copies) sont obtenues (Figure 2).

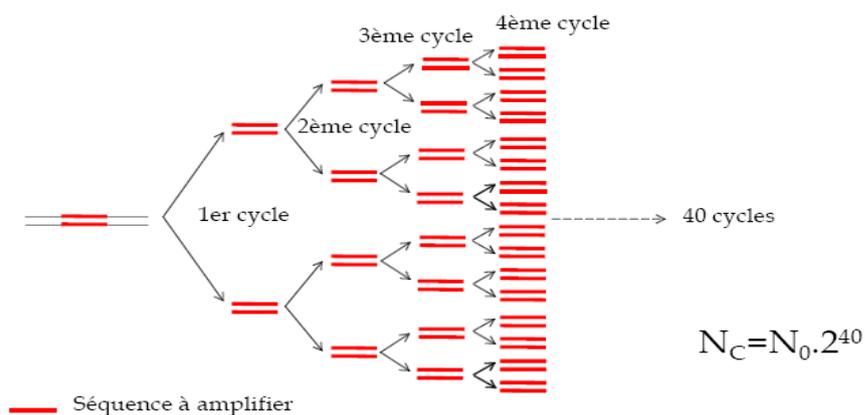


Figure 2: La PCR, une amplification exponentielle

5.2.2. Dessin d'amorce

Les amorces sont choisies par l'intermédiaire du logiciel primer express (Applied Biosystems) selon des critères bien définis :

- ✚ Les amorces ne doivent pas former de dimères, ni d'amplicons non spécifiques.
- ✚ Les amorces doivent permettre un doublement du nombre de cibles à chaque cycle

Les amorces retenues dans notre expérience sont répertoriées dans le tableau 2 ci-dessous :

| Primers | Sens | Anti-sens |
|----------------|-----------------------------|--------------------------|
| abcb1a | CATGACAGATAGCTTTGCAAGTGTAG | GGCAAACATGGCTCTTTTATCG |
| abcb1b | AAGCCAGTATTCTGCCAAGCAT | CTCCAGACTGCTGTTGCTGATG |
| abcc2 | AAGCAGATTGACACCAACCAGAA | GGCCGAGCAGAAGACAATCA |
| abcg2 | AACACTTCTCATGACAATCGCTTTT | GCCCAATGGTTCTGAGATTCAC |
| abcc1 | GAAGAAGGAATGTGATAAGTCAAGGAA | GGCTTGCTGGGATCTTTGG |
| TBP | ACTTCGTGCAAGAAATGCTGAA | GCAGTTGTCCGTGGCTCTCT |
| Cyp2b10 | TTTCTGCCCTTCTCAACAGGAA | ATGGACGTGAAGAAAAGGAACAAC |

Tableau 2: les séquences d'amorces utilisées pour la RT-PCR

5.2.3. Mise en œuvre de la QPCR

Dans un premier temps, pour tester l'efficacité des amorces, des conditions optimum de fonctionnements sont définies. Pour cela un pool de référence est réalisé en mélangeant des cDNA synthétisés à partir de plusieurs échantillons de foie différents. Des PCR quantitatives sont réalisées avec des rapports amorce sens/amorce antisens différents. Généralement des rapports 300/300, 300/900 et 900/300 sont testés. Les conditions qui permettent d'obtenir les meilleurs résultats sont retenues pour la suite de l'étude.

L'étape suivante consiste à tester si l'efficacité d'amplification avec ce couple d'amorce est de 100%. Ceci est un pré requis à l'utilisation de la méthode du $\Delta\Delta\text{CT}$ (décrite ultérieurement) pour le calcul permettant de déduire la quantité d'ARN de départ à partir des résultats d'amplification. Pour cela une gamme est réalisée. Pour le premier point de gamme le pool réalisé précédemment est dilué au 1/3 (STD1). A partir de cette première dilution des dilutions en série au 1/10^{ème} sont réalisées pour obtenir les points de gamme suivants (STD2, STD3, STD4, STD5). Pour une efficacité de PCR à 100%, la pente de la droite tracée à partir des résultats obtenus pour ces différents points de gamme doit être égale à $-3,33$.

Lorsque toutes ces manipulations préliminaires sont réalisées, les échantillons d'intérêts peuvent être analysés. Le mélange réactionnel dans chaque puits est composé de 5 μ l d'ADNc (dilution au 1/20), 12,5 μ l de Power Syber Green applied Master mix (enzyme + tampon + dNTP), de 7,5 μ l d'amorces sens et antisens.

Les cycles d'élongation sont débutés par une période de dénaturation et d'activation de l'enzyme et une 1 minute à 65°C suivi de 40 cycles de 10 secondes à 95°C, 10 secondes à 70°C, (taille de l'amplicon/25) secondes à 72°C. Le gène TBP (TATA-Binding Protein) considéré comme gène de normalisation est utilisé en parallèle. Le gène TBP dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes situations biologiques permet d'éviter que des modifications de quantités d'ADN dans l'essai soient analysées comme des différences d'expression. Le taux d'expression du gène d'intérêt est déterminé par rapport au gène TBP de référence.

5.2.4. Méthode du 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$

Une fois les Ct extraits et le gène de référence sélectionné, nous pouvons calculer la quantification relative du gène d'intérêt en comparaison avec le gène de référence chois.

Le ratio relatif d'expression (RQ) d'un échantillon compare a un échantillon contrôle est calcule de la façon suivante:

$$RQ = \frac{E_{\text{gène d'intérêt}}^{(Ct \text{ contrôle} - Ct \text{ échantillon})}}{E_{\text{gène de référence}}^{(Ct \text{ contrôle} - Ct \text{ échantillon})}}$$

Si l'efficacité d'amplification est bien de 100%, la formule suivante peut être appliquée :

$$RQ = \frac{2^{\Delta Ct \text{ gène d'intérêt}}}{2^{\Delta Ct \text{ gène de référence}}}$$

$$RQ = 2^{(\Delta Ct \text{ gène d'intérêt} - \Delta Ct \text{ gène de référence})}$$

$$RQ = 2^{\Delta \Delta Ct}$$

6. Test de fonctionnalité des transporteurs d'efflux

Les cellules sontensemencées sur des plaques de culture 6 puits à une densité de 10^5 cellules/puits et cultivées pendant 24 heures à 37°C. Afin de suivre l'efflux du Hoechst 33342, les cellules sont incubées 40 mn à 34°C dans du milieu HBSS contenant le marqueur Hoechst 33342 (ref. 41399, Invitrogen) à 10µM additionné de DMSO à 1% pour les témoins, ou du KO134 (1µM), ou du valsopodar (5µM), ou du probénécide (2mM), ou de l'ivermectine (10µM). La réaction est arrêtée par passage sur de la glace pendant 5mn. Les milieux sont éliminés et les cellules lavées avec de la solution saline tamponnée de Hanks' (HBSS) froid (4°C). Les cellules sont lysées avec 0.5 ml de PBS 1X contenant 0.5% de SDS. Après addition de 0.5 ml de PBS 1X, la fluorescence intracellulaire est mesurée en spectrophotométrie (Perkin Elmer modèle LS 50 B ; $\lambda_{\text{max}} \text{ excitation} = 355 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{max}} \text{ émission} = 465 \text{ nm}$) dans des cuves à usage unique.

7. Suivi du transport de l'ivermectine par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les cellules sont cultivées et traitées comme décrit dans le paragraphe (I.2.2). Afin de mesurer la concentration d'ivermectine dans les cellules, nous avons effectué des prélèvements à différents temps:

- 1 ml du milieu de culture avec l'ivermectine (valeur 100%)
- 1 ml du milieu de culture après exposition pendant 24 heures (milieu T1)
- 1 ml du milieu de culture après une exposition de 48 heures (milieu T2)

Après les 48 heures de traitement, les cellules sont lysées et stockées à -20°C jusqu'à l'analyse par HPLC.

7.1. Technique d'extraction de l'ivermectine

Les milieux et les lysats cellulaires (200µl) sont extraits grâce à 1ml d'acétonitrile par agitation mécanique pendant 20 minutes. Les échantillons sont centrifugés (SIGMA 1K15) à la vitesse de 16 300 g à 4°C pendant 5 minutes. La phase organique est prélevée dans sa totalité et transférée dans un tube Pyrex.

7.2. Dosage de l'ivermectine par HPLC

7.2.1. Evaporation

Les contenus des tubes pyrex sont évaporés au moyen d'un évaporateur Turbo Vap (Zymark), à une température de 60°C sous un flux d'azote pendant 14 minutes jusqu'à l'obtention d'un extrait sec.

7.2.2. Préparation des standards

La solution standard d'ivermectine (10 ng sous un volume de 20 µL) est évaporée comme d'écrit précédemment.

7.2.3. Dérivatisation

Après évaporation, les tubes Pyrex sont refroidis, l'extrait sec est repris par :

- 100 µL de réactif A : 1N-méthylimidazole / acétonitrile (1/1) (base catalytique) puis après agitation
- 150 µL de réactif B : trifluoroacétique anhydre / acétonitrile (1/2) acylation du cycle benzofurane).

Cette réaction de dérivation va permettre de générer un composé fluorescent qui sera détecté et quantifié par HPLC.

7.2.4. Injection

Les échantillons fluorescents (200 µL) sont transférés dans les tubes à injection (250 µL) à fond plat, placés dans des flacons opaques et fermés (septum Teflon). L'injection est

réalisée grâce à un injecteur automatique 360 (KONTRON) comportant une boucle d'un volume de 100 µL.

7.2.5. Conditions chromatographiques

Les échantillons dérivatisés sont injectés dans le système chromatographique composé d'une pompe M 420 (KONTRON) à débit constant : 1,5 mL/mn, d'un injecteur automatique 360 (KONTRON). La séparation est réalisée grâce à une colonne SUPERCOSIL LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5µm) et une phase mobile : mélange d'acide acétique 0,02% / méthanol / acétonitrile (1,8/40/58,2 v/v/v). L'éluat est analysé par un détecteur de fluorescence FP 2020 (JASCO) (λ_{\max} excitation= 355 nm, λ_{\max} émission = 365 nm). La quantification est réalisée par standard externe donc par référence à la solution standard (10 ng) et à l'aide d'un logiciel de traitement de données (Kroma system 2000).

8. Tests statistiques

Toutes les données sont soumises à une analyse statistique utilisant le test d'ANOVA à un facteur. Dans tous les cas, une valeur de $P < 0,05$ comparée au traitement témoin est considérée comme significative.

II. RESULTATS

1. Caractérisation de la lignée cellulaire

1.1. Expression des transporteurs MDR et cytochrome

Nous avons entrepris dans un premier temps de caractériser notre modèle cellulaire par rapport à l'expression des transporteurs ABC et de cytochromes P450 qui nous intéressaient dans le cadre de notre étude. L'expression des transporteurs et cytochrome dans les cellules JWZ et JWZC19 est caractérisée par RT-PCR quantitative à partir des ARNs isolés de ces cellules. Les valeurs obtenues sont normalisées par rapport au gène de référence TBP.

Les quantifications des messagers Cyp2b10 dans les lignées JWZ et JWZC19 montrent une expression plus importante dans la lignée JWZC19 que dans la lignée JWZ. Ceci est concordant avec le fait que cette lignée surexprime le récepteur nucléaire CAR. En effet, CAR étant un récepteur nucléaire constitutivement actif et localisé dans cette lignée cellulaire au niveau du noyau, sa surexpression dans les cellules se traduit par une surexpression de son gène cible préférentiel Cyp2b10 (figure 3).

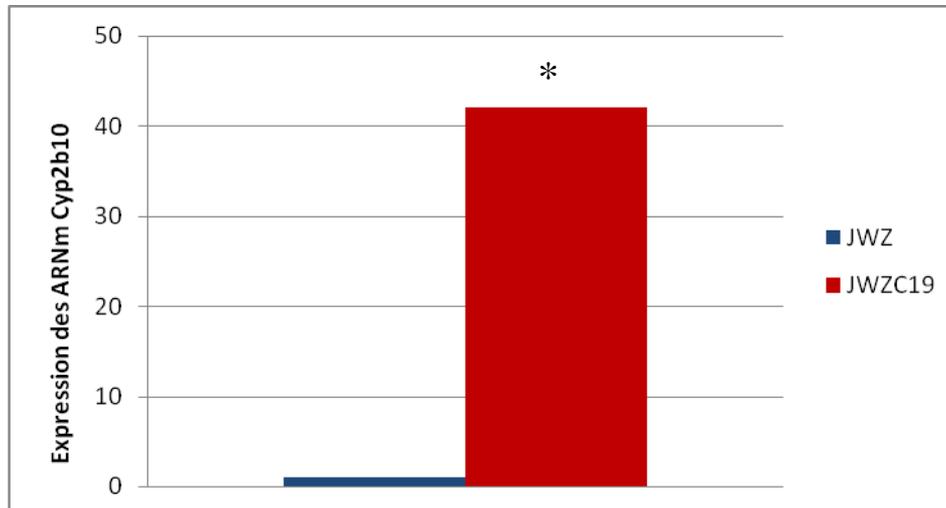


Figure 3 : expression constitutive de Cyp2b10 dans les lignées JWZ et JWZC19
(* : P < 0,05 comparé au témoin)

Les quantifications des messagers des transporteurs ABC montrent une expression plus importante des gènes *abcc1*, *abcb1b* et *abcg2* dans la lignée JWZC19 (ratio supérieur à 1). Par contre, les gènes *abcb1a* et *abcc2* y sont faiblement exprimées (ratio inférieur 0,5) figure 4.

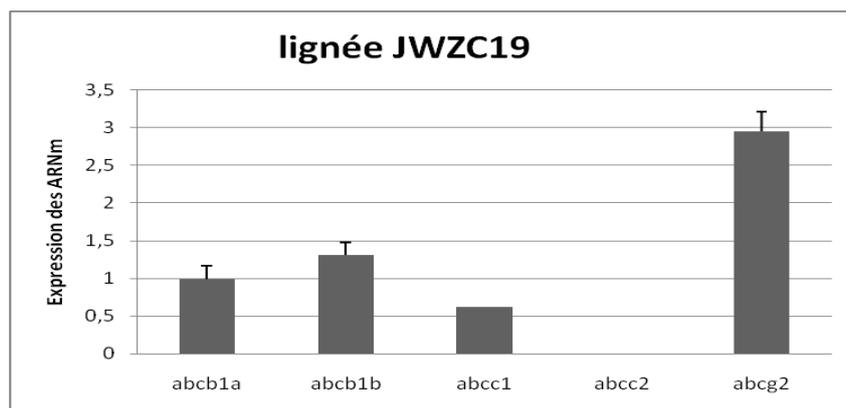


Figure 4: expression constitutive des transporteurs dans la lignée JWZC19

Les cellules de chaque lignée sont exposées à 2µl de DMSO pendant 48 heures et l'expression des ARNm transcrits de chaque gène d'intérêt est déterminées par PCR quantitative après normalisation par rapport au gène de ménage TBP.

Ayant montré la présence de messagers de ces transporteurs ABC dans notre modèle d'étude, nous avons entrepris une étude sur leur fonctionnalité à travers leur capacité à refluer un composé fluorescent en dehors de la cellule.

1.2. Fonctionnalité des transporteurs

L'étude de la fonction d'efflux des transporteurs est réalisée dans les cellules JWZC19 par l'utilisation d'un composé fluorescent. Le Hoechst 33342, connu pour être un substrat de nos transporteurs d'intérêt, est un bisbenzimidazole qui pénètre dans les cellules et se fixe à l'ADN des cellules vivantes (colorant vital). L'accumulation intracellulaire du Hoechst 33342 est suivie en présence d'inhibiteurs sélectifs de chaque transporteur (figure 5).

Le valsopodar analogue de la cyclosporin-A, est un inhibiteur de référence de la p-glycoprotéine. Son action sur les cellules se traduit par une accumulation de la fluorescence intracellulaire plus importante que celle observée dans les cellules témoin (130 contre 100).

Le même effet est observé avec le probénécide qui est reconnu comme un inhibiteur de l'activité d'efflux de la MRP1 [6].

Une activité d'accumulation 2 fois plus importante par rapport au témoin du Hoechst 33342 est observée en présence du KO134 (analogue tétracyclique de la fumitremorgine C) qui est utilisé comme un inhibiteur de référence de la fonction de transport de abcg2.

Une activité d'accumulation du Hoechst 33342 également 2 fois plus important par rapport au témoin est observée en présence d'ivermectine dont l'activité inhibitrice de transport de

la P-gp, de la MRP et de BCRP a été montrée par des travaux antérieurs de l'équipe d'accueil [16].

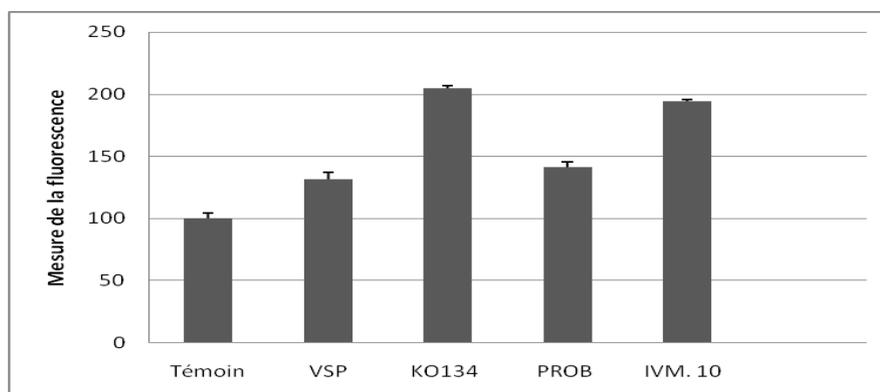


Figure 5: analyse quantitative de l'accumulation intracellulaire de Hoechst 33342

Les cellules JWZC19 sont incubées dans du milieu HBSS contenant le marqueur Hoechst 33342 à 10 μ M avec du DMSO (1%) pour les témoins, ou du KO134 (1 μ M), ou du valsopodar (5 μ M), ou du probénécide (2mM), ou de l'ivermectine (10 μ M)

1.3. Conclusion

Ayant validé notre modèle cellulaire par rapport à l'expression et la fonctionnalité des ABC transporteurs nous nous sommes attachés à l'étude de l'inductibilité de leur expression sous exposition à différentes concentrations d'ivermectine.

2. Influence de l'ivermectine sur l'expression des gènes codant pour le cytochrome Cyp2b10 et les transporteurs ABC

Les cellules de la lignée JWZC19 sont soumises à différentes concentrations d'ivermectine (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M et 10 μ M). Le niveau d'expression des gènes d'intérêt est mesuré par RT-PCR quantitative. Parallèlement à nos gènes d'intérêt, nous avons testé l'expression du gène Cyp2b10 comme référence dans notre modèle cellulaire. Les cellules JWZC19 surexprimant le xénosenseur CAR, ont été exposées pendant 48 heures à de l'ivermectine à doses croissantes (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M et 10 μ M), du DMSO ou du TCPOBOP (100nM) qui est utilisé comme traitement témoin positif des cellules car c'est le ligand synthétique de CAR.

Le TCPOBOP, est connu pour induire l'expression du gène Cyp2b10 d'un facteur 2 environ par rapport au témoin DMSO. Cet effet d'induction du messager Cyp2b10 par le TCPOBOP est bien retrouvé dans notre expérience (figure 6). Pour ce qui concerne l'ivermectine aucun effet dose n'a pu être observé. Cependant un résultat intéressant que nous avons reproduit plusieurs fois correspond à une forte inhibition du messager Cyp2b10 lors d'une exposition à 10 μ M d'ivermectine.

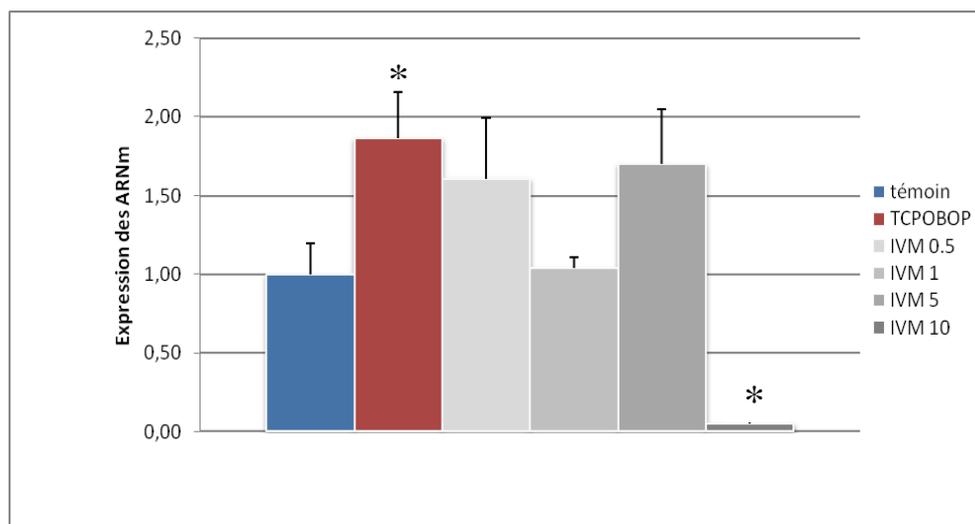


Figure 6: Influence de l'ivermectine sur l'expression du gène Cyp2b10 sur la lignée JWZC19

Les cellules JWZC19 sont exposées à 2µl de DMSO témoin, ou 2µl de tcprobop ou 2µl d'ivermectine à des doses croissantes pendant 48 heures. Les expressions des ARNm transcrits du gène Cyp2b10 sont déterminées par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. L'histogramme montre les résultats de l'expression du gène CYP2B10 après comparaison de trois expériences indépendantes.

(* : P < 0,05 comparé au témoin)

La quantification du messenger Abcb1a traduit une petite induction sous l'effet du TCPOBOP et surtout une augmentation dose-dépendante pour ce qui concerne les inductions à l'ivermectine. (Figure 7). Avec la plus forte dose, un facteur d'induction d'environ 2 est observé.

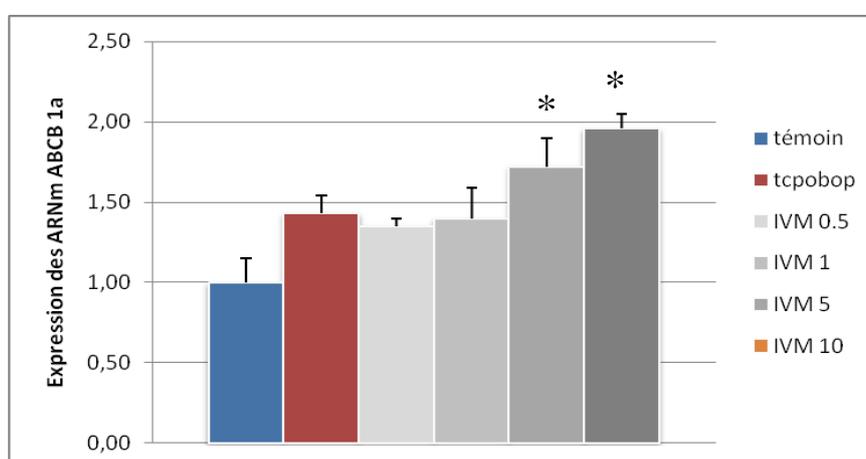


Figure 7: Influence de l'ivermectine sur l'expression du gène Abcb1a sur la lignée JWZC19

(* : P < 0,05 comparé au témoin)

Les quantifications des messagers des gènes abcb1b, abcc1, abcc2, et abcg2, ne montrent pas modification significative sous l'effet du TCPOBOP. Aucun effet-dose net n'a pu être observé sous exposition aux différentes doses d'ivermectine (Figures 8). Les quantifications des messagers du gène abcc2 ont montré beaucoup de variabilité d'une expérience à l'autre probablement liée à la faible quantité de ce messenger dans les

cellules. En effet les quantifications sont moins fiables lorsque les cibles sont présentes en trop faible quantité dans les cellules (figure 8).

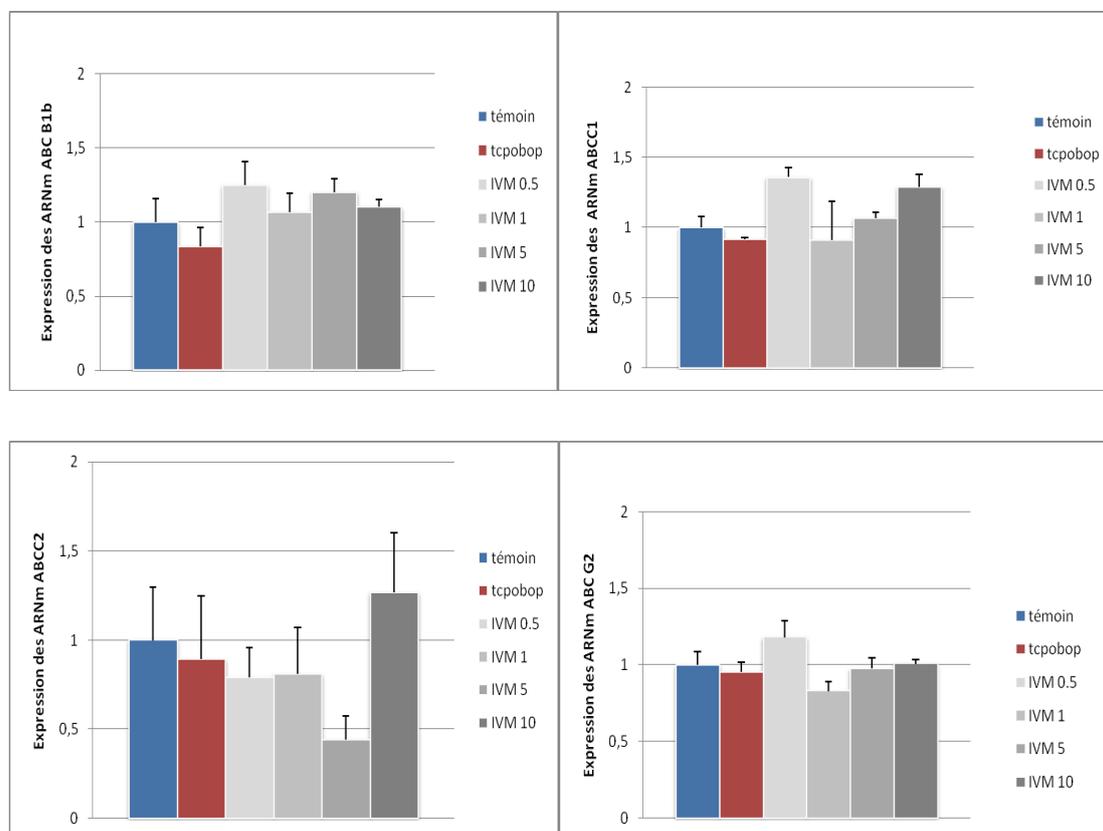


Figure 8: Influence de l'ivermectine sur l'expression des gènes Abcb1b, abcc1, abcc2 et abcg2 sur la lignée JWZC19

2.1. Implication de CAR dans les modulations d'expression de gènes observées

Afin de déterminer si les modulations d'expression de Cyp2b10 et abcb1a observées sont médiées par le récepteur nucléaire CAR, nous avons entrepris des expériences d'induction parallèles sur les deux lignées JWZ et JWZC19. La lignée JWZ diffère de la lignée JWZC19 par le fait que cette dernière surexprime le récepteur nucléaire CAR. Seule la plus haute concentration d'ivermectine (10 μ M) a été utilisée dans cette étude. Les résultats rapportés sur la figure 9 montrent que les modulations d'expression des gènes Cyp2b10 et abcb1a observées dans les lignées JWZC19 ne sont pas retrouvées dans la lignée JWZ. Ceci montre l'implication de CAR dans les modulations d'expression de gènes observées.

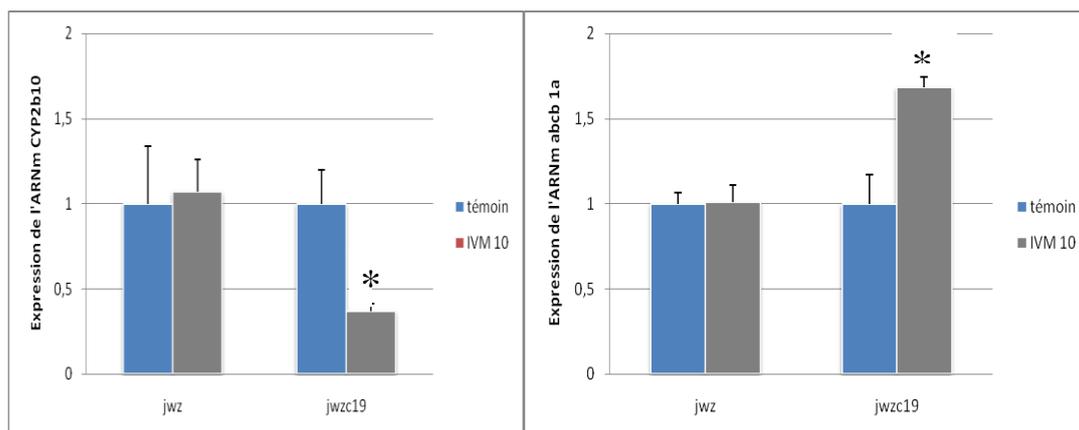


Figure 9: Influence de l'ivermectine à 10µM sur l'expression des gènes Cyp2b10 et abcb1a dans la lignée JWZC19 et JWZ. Chaque lignée cellulaire est exposée à 2µl de DMSO ou 2µl d'ivermectine à 10µM et les expressions des ARNm sont déterminées. (* : P < 0,05 comparé au témoin)

3. Dosage de l'ivermectine

Pour vérifier la quantité d'ivermectine intracellulaire, après 48 heures de traitement, les cellules sont lysées et le tout est dosé par HPLC. Les résultats sont présentés dans le tableau 3 suivant :

| | JWZ | | | JWZC19 | |
|-----------------------------------------------|------|------|------|--------|------|
| Concentration introduite (µM) dans le milieu | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 |
| Concentration calculée (µM) dans les cellules | 0,09 | 0,44 | 0,79 | 0,045 | 0,39 |

Tableau 3: Dosage de l'ivermectine dans les cellules JWZ et JWZC19

III. DISCUSSION

La modulation d'expression des transporteurs par les lactones macrocycliques n'avait jamais été décrite jusqu'alors. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la modulation d'expression des transporteurs *abcb1a*, *abcb1b*, *abcc1*, *abcc2*, *abcg2* et à celle du cytochrome *Cyp2b10* par l'ivermectine dans deux lignées d'hépatocytes primaires de souris immortalisés : la lignée JWZ et l'équivalente surexprimant le récepteur nucléaire CAR, la lignée JWZC19.

Dans un premier temps, nous avons étudié la fonctionnalité de différents transporteurs cibles dans le modèle cellulaire JWZC19 à l'aide d'un substrat Hoechst 33342 commun à plusieurs transporteurs d'intérêts.

Dans les cellules sans inhibiteur la faible accumulation intracellulaire de substrat reflète la forte activité de transport dans notre modèle cellulaire (figure 6). Par contre, la forte rétention du Hoechst 33342 observée dans les cellules exposées aux inhibiteurs sélectifs de chaque transporteur : le valsopodar, le probénécide, le KO 134 ou l'ivermectine fait état de l'inhibition de la fonction d'efflux. On peut suggérer ici, la fonctionnalité de chacun des transporteurs dont on a utilisé les inhibiteurs respectifs dans l'ordre : P-gp, MRP et BCRP.

Nous avons aussi évalué l'abondance relative des transporteurs ABC étudiés et du cytochrome *Cyp2b10* dans nos deux lignées cellulaires, nous avons calculé l'expression des ARNm. L'expression du gène *Cyp2b10* dans les lignées JWZC19 surexprimant CAR est plus importante que dans la lignée JWZ témoin. Ceci est concordant avec le fait que cette lignée surexprime le récepteur nucléaire CAR.

Nous avons aussi montré que les transporteurs les plus exprimés dans ces lignées sont présents à hauteur de 0,5 à 3 par valeur d'expression (figure 4). Ainsi, la présence des transporteurs est en accord avec l'activité des transporteurs mesurée plus haut.

Sur la base de ces résultats, nous avons ici un modèle cellulaire qui nous permettra de conclure sur la présence et la fonctionnalité des transporteurs d'efflux.

La modulation de l'expression des gènes codant pour les transporteurs MDR et le cytochrome *Cyp2b10* par l'ivermectine a été étudiée sur la lignée cellulaire JWZC19 décrite plus haut. Le TCPOBOP ligand synthétique de CAR, qui est connu comme étant un

inducteur des enzymes microsomiales et notamment du gène Cyp2b10, est utilisé dans notre étude comme contrôle positif de notre modèle [14]. Le TCPOBOP provoque une translocation de CAR du cytoplasme vers le noyau et une sur-activation de CAR par rapport à son activité constitutive de base. Il agit par liaison directe au domaine de liaison du ligand (LBD) de CAR pour l'activer. Les travaux de Wei en 2000 [26] ont montré que chez des souris dont le gène CAR a été invalidé, la réponse au TCPOBOP du gène Cyp2b10 est complètement abolie, tandis que le niveau basal d'expression est diminué, suggérant une contribution positive de CAR à l'expression normale de ce gène. En outre, l'activation de CAR par le TCPOBOP a augmenté l'induction des enzymes de métabolisation et des transporteurs [11]. Ainsi, les xénobiotiques qui activent CAR peuvent régler le métabolisme des xénobiotiques et leur transport.

En partant de ces travaux et sur la base de nos résultats, l'augmentation d'expression des ARNm du gène Cyp2b10 sous l'effet du traitement au TCPOBOP vient confirmer l'implication du xénosenseur CAR dans la modulation de l'expression du gène Cyp2b10. Une répression massive du gène Cyp2b10 est observée en présence de l'ivermectine à 10 μ M, les autres concentrations ne semblant pas influencer son expression. Ce résultat est particulièrement original et laisse entrevoir le rôle d'inhibiteur de l'ivermectine vis-à-vis de cytochromes P450 via CAR (figure 6). L'absence de cet effet de répression du gène dans les cellules témoins JWZ vient confirmer l'implication de CAR dans la modulation de l'expression (figure 9). Les gènes cibles de CAR codent le plus souvent pour des protéines impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques.

En 2001, Ueda et al. [25] utilisèrent des techniques de RT-PCR et de puces d'ADNc pour examiner l'expression des gènes chez des souris normales et déficientes en CAR. Ils montrèrent qu'un total de 138 gènes étaient soit induits soit réprimés en réponse à un traitement au phénobarbital (PB), dont environ la moitié était sous la dépendance de CAR. Cependant, le nombre de gènes régulés par CAR reste une question majeure. D'autres auteurs (Cherrington et al., 2002 [7]; Johnson and Klaassen, 2002 [13]; Cherrington et al., 2003 [8]; Slitt et al., 2003; Assem et al., 2004 [2]; Maher et al., 2005a [21]) ont montré également que CAR était impliqué dans l'induction de protéines associées à la multidrogue résistance résistance de multidrug (MRP : Mrp2, Mrp3, et Mrp4).

Nous avons observé pour la première fois dans notre modèle cellulaire que l'ivermectine induit de façon dose-dépendante l'expression du messenger *abcb1a* via CAR (figure 7). En effet dans les cellules JWZC19 surexprimant CAR, une augmentation significative d'expression des ARNm transcrits du gène *abcb1a* est observée ce qui suggère que le récepteur nucléaire CAR intervient dans la modulation de l'expression de ce gène. Cet effet n'a pas été reproduit dans les cellules témoins (JWZ) après traitement au TCPOBOP et à l'ivermectine à 10µM (figure 9). Les résultats rapportés dans la littérature sont contradictoires quant-à l'implication de CAR dans la régulation du gène *abcb1*. Certains auteurs ont identifié ce gène comme une cible de CAR [3,4]. Par contre, d'autres auteurs [20] ont montré que l'induction hépatique de *abcb1a* par le TCPOBOP était indépendant de l'expression de CAR. Au regard des résultats obtenus sur les cellules témoins (JWZ), le récepteur nucléaire CAR semble être impliqué dans l'effet d'induction par l'ivermectine que nous avons observé. En effet, nous avons démontré que dans les cellules (JWZ) l'induction d'expression du gène *Abcb1a* observé après traitement au TCPOBOP et à l'ivermectine à 10µM n'est pas reproduite. Par contre dans les cellules JWZC19 surexprimant CAR, une augmentation significative d'expression des ARNm transcrits du gène *Abcb1a* est observée ce qui suggère que le récepteur nucléaire CAR intervient dans la modulation de l'expression de ce gène.

Concernant les gènes *abcb1b*, *abcc1*, *abcc2* et *abcg2* nous avons montré que ni l'ivermectine ni le TCPOBOP n'ont d'influence sur l'expression de leurs ARNms (figure 8).

Le dosage de l'ivermectine dans les cellules a permis de déterminer les concentrations effectives auxquelles sont exposées les cellules. Ceci a permis de démontrer que de faibles quantités d'ivermectine atteignent la cellule et sont à l'origine des modulations d'expression (tableau 3).

L'influence de l'ivermectine sur l'expression du gène de la P-gp est une information nouvelle et majeure en thérapeutique antiparasitaire. Un traitement parasitaire par l'ivermectine entraîne une exposition de l'organisme hôte à des concentrations qui fluctuent dans le plasma entre 1 et 200 nM [12]. Compte tenu du fait que dans les tissus les concentrations d'ivermectine sont 10 à 100 supérieures à celles retrouvées dans le plasma, nous pouvons ainsi nous attendre à ce que l'imprégnation tissulaire soit en rapport avec les concentrations mesurées ici dans les cellules exposées à 10 µM d'ivermectine (790 nM). Ainsi, un traitement à l'ivermectine aux doses thérapeutiques, pourrait augmenter

l'expression du gène de la P-gp. Si cette augmentation est associée à une augmentation de l'expression de la protéine, ce qui devra être vérifié, nous pouvons nous attendre à une augmentation de l'activité d'efflux de ce transporteur. Ce point devra être vérifié *in vivo* chez l'animal traité à l'ivermectine (rongeurs et animaux de rentes). Les conséquences de l'induction de la P-gp seraient une protection accrue de l'animal aux xénotoxiques mais aussi une résistance aux médicaments substrats de la P-gp, notamment aux LMs.

L'intervention probable de CAR dans l'induction de l'expression de la P-gp représente une information majeure pour la compréhension des mécanismes de résistance aux LMs chez les nématodes. Ces travaux serviront de support à des recherches ultérieures quant à la présence de récepteurs nucléaires homologues de CAR chez les nématodes et de leur possible intervention dans la surexpression de la P-gp lors de résistance aux LMs.

CONCLUSION

La découverte des LMs a conduit, à un véritable bouleversement dans la lutte contre certaines parasitoses. La biodisponibilité des lactones macrocycliques est modulée par différents facteurs endogènes dont le transporteur membranaire Pgp. Les transporteurs d'efflux participent à la protection de l'organisme en s'opposant à la pénétration des xénobiotiques, limitant ainsi leur toxicité. En revanche, les pompes d'efflux peuvent également avoir une action délétère en réduisant la biodisponibilité des médicaments qu'elles transportent. De plus, reliés à certaines pathologies, ils peuvent être modulés par ces dernières ou, à l'inverse, participer au processus pathologique. La co-administration de composés interférant avec la Pgp permet de moduler la quantité de médicament dans l'organisme animal mais aussi au niveau du parasite. De nouvelles perspectives sont ouvertes quant à l'utilisation de ces molécules. Ainsi, le fait que l'ivermectine soit un substrat et inducteur de l'expression du gène *Abcb1a* susciteront des études sur la relation résistance parasitisme et surexpression des ABC transporteurs.

Un autre résultat intéressant qui de notre étude est la capacité de l'ivermectine à inhiber l'expression du gène *Cyp2b10* de manière CAR dépendante. Seuls les androstanes (androsténol et androstanol) ont été décrits comme présentant cette propriété. La découverte d'autres inhibiteurs de CAR ouvre la voie à de nouvelles recherches visant à mieux comprendre les mécanismes de fonctionnement de ce récepteur nucléaire un peu particulier.

BIBLIOGRAPHIE

- 1-ALVINERIE, M., DUPUY, J., EECKHOUTTE, C, AND SUTRA, J. F. (1999). Enhanced absorption of pour-on ivermectin formulation in rats by co- administration of the multidrug-resistant-reversing agent verapamil. *Parasitol Res* 85, 920-922.
- 2- ASSEM M, SCHUETZ EG, LEGGAS M, SUN D, YASUDA K, REID G, ZELCER N, ADACHI M, STROM S, EVANS RM, MOORE DD, BORST P AND SCHUETZ JD (2004) Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J Biol Chem* 279:22250-22257.
- 3- BURK O, ARNOLD KA, GEICK A, TEGUDE H, EICHELBAUM M., 2005: A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *Biol Chem.*386(6): 503-13.
- 4- CERVENY L., SVECOVA L., ANZENBACHEROVA E., VRZAL R., STAUD F., DVORAK Z., ULRICHOVA J., ANZENBACHER P. AND PAVEK P., 2007 : Valproic Acid Induces CYP3A4 and MDR1 Gene Expression by Activation of Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Pathways. *Drug Metab Dispos* 35: 1032-1041.
- 5- CHANG, T. H., K. HAKAMADA, Y. TOYOKI, S. TSUCHIDA, AND M. SASAKI. 2004. Expression of MRP2 and MRP3 during liver regeneration after 90% partialhepatectomy in rats. *Transplantation* 77:22-7.
- 6- CHAUVIER D, KEGELAER G, MORJANI H, MANFAIT M. Reversal of multidrug resistance-associated protein-mediated daunorubicin resistance by camptothecin. *J Pharm Sci* 2002; 91: 1765-75.
- 7- CHERRINGTON NJ, HARTLEY DP, LI N, JOHNSON DR AND KLAASSEN CD (2002) Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) Mrna and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 300:97-104.
- 8- CHERRINGTON NJ, SLITT AL, MAHER JM, ZHANG X, ZHANG J, HUANG W, WAN YY, MOORE DD AND KLAASSEN CD (2003) Induction of multidrug resistance protein 3 (MRP3) in vivo is independent of constitutive androstane receptor. *Drug Disp Metab*31:1315-1319.

- 9- DUPUY, J., LARRIEU, G., SUTRA, J. F., EECKHOUTTE, C, AND ALVINERIE, M. (2001B). Influence of verapamil on the efflux and metabolism of ¹⁴C moxidectin in cultured rat hepatocytes. *J Vet Pharmacol Ther* 24, 171-177.
- 10- DUPUY, J., LARRIEU, G., SUTRA, J. F., LESPINE, A., AND ALVINERIE, M. (2003). Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Vet Parasitol* 112, 337-347.
- 11- GUO GL, LAMBERT G, NEGISHI M, WARD JM, BREWER HB, JR., KLIEWER SA, GONZALEZ FJ AND SINAL CJ (2003) Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 278:45062-45071.
- 12- HENNESSY, D.R., ALVINERIE, M.R. 2002. Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms. In: Rew, R.S. (Ed), *Macrocyclic Lactones and Antiparasitic Therapy*. CAB International, pp. 97-123.
- 13- JOHNSON DR AND KLAASSEN CD (2002) Regulation of rat multidrug resistance protein 2 by classes of prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription pathways. *Toxicological Sciences* 67:182-189.
- 14- KLASSEN C.D., SLITT A.L. 2005: Régulation of Hepatic Transporters by Xenobiotic Receptors : *Current Drug Metabolism*, 2005, Vol. 6, No. 4 309-328
- 15- LANKAS GR, CARTWRIGHT ME, UMBENHAUER D - P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 143 : 357-365.
- 16- LESPINE A, ALVINERIE M, VERCRUYSSSE J, PRICHARD RK, GELDHOF P. ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends Parasitol*. 2008 May 28.
- 17- LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., SALLOVITZ, J., IMPERIALE, F., PIS, A., AND LANUSSE, C. (2002). Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 25, 111-120.
- 18- LOSCHER, W., AND H. POTSCHKA.: Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx*, 2005a, 2:86-98.

- 19- LOSCHER, W., AND H. POTSCSKA.: Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol*, 2005b, 76:22-76.
- 20- MAGLICH, J.M., STOLTZ, C.M., GOODWIN, B., HAWKINS-BROWN, D., MOORE, J.T., AND KLIEWER, S.A. (2002). Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol. Pharmacol.* 62, 638–646.
- 21- MAHER JM, CHENG X, SLITT AL, DIETER MZ AND KLAASSEN CD (2005A) Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 33:956-962.
- 22- MEALEY KL, BENTJEN SA, GAY JM, CANTOR GH – Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 2001 ; 11 : 727-733.
- 23- SCHINKEL A.H., JONKER J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(1): 3-29.
- 24- SLITT AL, CHERRINGTON NJ, MAHER JM AND KLAASSEN CD (2003) Induction of multidrug resistance protein 3 in rat liver is associated with altered vectorial excretion of acetaminophen metabolites. *Drug Disp Metab* 31:1176-1186.
- 25- UEDA A., HAMADEH H.K., WEBB H.K., YAMAMOTO Y., SUEYOSHI T., A. AFSHARI C.A., LEHMANN J.M., NEGISHI M. (2002) Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to Phenobarbital. *Molecular Pharmacology*, 61(1):1-6.
- 26- WEI P., ZHANG J., EGAN-HAFLEY M., LIANG S., MOORE DD. The nuclear receptors CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 2000; 407: 920-3.
- 27- XU, M., MOLENTO, M., BLACKHALL, W., RIBEIRO, P., BEECH, R., AND PRICHARD, R. (1998). Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *MolBiochemParasitol* 91, 327-335.